

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

**NOTIFICATION D'ELECTION**

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition 28 décembre 2000 (28.12.00)	
Demande internationale no: PCT/FR00/01670	Référence du dossier du déposant ou du mandataire: BLOcp263/55P
Date du dépôt international: 16 juin 2000 (16.06.00)	Date de priorité: 18 juin 1999 (18.06.99)
Déposant: ARACTINGI, Selim etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 octobre 2000 (11.10.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  J. Zahra no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/FR 00/01670

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 C07K14/74 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT, LIFESCIENCES, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ULBRECHT M ET AL: "HLA-G: EXPRESSION IN HUMAN KERATINOCYTES IN VITRO AND IN HUMAN SKIN IN VIVO" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 1, 1994, pages 176-180, XP002007031 paragraph '03.3!; figure 4 page 180, column 1	1-3
X	WO 98 37098 A (CAROSELLA EDGARDO DELFINO ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); KIR) 27 August 1998 (1998-08-27) cited in the application page 4, line 26 -page 6, line 2 claims 1,12-14 -/--	4-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2000

Date of mailing of the international search report

21/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter / Application No  
PCT/FR 00/01670

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 31604 A (UNIV CALIFORNIA) 10 October 1996 (1996-10-10) claims 1-3, 15-18 ----	7
A	EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 18 October 1995 (1995-10-18) cited in the application -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern.

Application No

PCT/FR 00/01670

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837098	A	27-08-1998	FR 2760023 A	28-08-1998
			CA 2251645 A	27-08-1998
			EP 0917538 A	26-05-1999
WO 9631604	A	10-10-1996	AU 696118 B	03-09-1998
			AU 5256896 A	23-10-1996
			CA 2213620 A	10-10-1996
			EP 0819171 A	21-01-1998
			JP 11503320 T	26-03-1999
EP 0677582	A	18-10-1995	FR 2717498 A	22-09-1995
			US 5856442 A	05-01-1999

Translation  
09/9261

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BLOcp263/55P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01670	International filing date ( <i>day month year</i> ) 16 June 2000 (16.06.00)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 18 June 1999 (18.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/17		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 October 2000 (11.10.00)	Date of completion of this report 03 July 2001 (03.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01670

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description. pages 1-16 . as originally filed.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☐ the claims. Nos. 1-7 . as originally filed.  
Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☐ the drawings. sheets/fig 1/4-4/4 . as originally filed.  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

## Novelty:

1. Europ. J. of Immunology, vol. 24, no. 1, 1994, pp. 176-180 (1) (cf. page 179, left-hand column under 3.3 and page 180, left-hand column) describes the detection of HLA-G in healthy and diseased epidermal tissue. Therefore, claims 1 to 7 appear to be novel.

2. WO-A-98/37098 (2) (cf. abstract, page 4, line 26 to page 6, line 2, claims 1 and 12-14) describes the use of a composition containing a form of HLA-G having immunomodulating activity, and useful for inhibiting NK killer cells, graft versus host reactions, and recurrent abortions. Therefore, claims 1 to 7 appear to be novel.

3. WO-A-96/31604 (3) (cf. abstract, claims 1-3, 15-18, 26 and 27) describes a soluble antibody to HLA-G directed against a specific peptide exon 2. Therefore, claim 7 appears to be novel.

4. EP-A-0 677 582 (4) (cf. abstract, claims 27, 20-23, 1-4, 16-18) describes soluble antibodies to HLA-G directed against HLA-G4. Therefore, claim 7 appears to be novel.

## Inventive step:

The closest prior art document is (2), which describes medical uses of HLA-G without specifying the form (soluble or insoluble) thereof. The problem addressed by the present application appears to be that of treating inflammatory skin diseases. The solution appears to involve the use of a specific soluble form of HLA-G. This solution cannot be derived from the prior art. The method for preparing a soluble HLA-G as per claims 4 to 6 likewise cannot be derived from the prior art.



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 05 JUL 2001



WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/55P	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01670	Date du dépôt international (jour/mois/année) 16/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 18/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K38/17		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
  - I ☒ Base du rapport
  - II ☐ Priorité
  - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
  - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
  - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
  - VI ☐ Certains documents cités
  - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
  - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 03.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Smetankine, L N° de téléphone +49 89 2399 8466 

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01670

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-16                      version initiale

### Revendications, N°:

1-7                      version initiale

### Dessins, feuilles:

1/4-4/4                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01670

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**RAPPORT D'EXAMEN**  
**PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

---

Demande internationale n° PCT/FR00/01670

V

Nouveauté:

1. Europ. J. of Immunology, vol.24, n°1, 1994, pp. 176-180 (1) - cf. page 179, colonne de gauche sous 3.3 et page 180 colonne de gauche, décrit la détection du HLA- G dans les tissus de l'épiderme sain et malade: il serait pratiquement absent dans les tissus malades, par conséquent les revendications 1 à 7 semblent nouvelles.
2. WO - A - 98/37098 (2) - cf abrégé, page 4 ligne 26 à page 6 ligne 2, revendications 1,12-14, décrit l'utilisation une composition contenant une forme d'HLA - G à action immunomodulante , destinée à inhiber les cellules tueuses NK: rejet des greffes, prévention des avortements à répétition, par conséquent les revendications 1 à 7 semblent nouvelles.
3. WO - A - 96/31604 (3) - cf. abrégé, revendications 1-3,15-18, 26 et 27, décrit un anticorps anti- HLA- G soluble dirigé contre un peptide spécifique exon 2, par conséquent la revendication 7 semble nouvelle.
4. EP - A - 0 677 582 (4) - cf. abrégé, revendications 27, 20-23,1-4,16-18, décrit des anticorps anti- HLA- G soluble dirigés contre HLA- G4, par conséquent la revendication 7 semble nouvelle.

Activité inventive:

Le document le plus proche est (2) qui décrit des utilisations médicales de HLA - G sans que soit précisée sa forme ( soluble ou insoluble ). Le problème à résoudre de la présente demande serait le traitement des pathologies inflammatoires de la peau. La solution serait d'utiliser une forme soluble de HLA G spécifique. Cette solution ne peut pas être déduite de l'art antérieur. Le procédé de préparation d'une HLA - G soluble selon les revendications 4 à 6 ne peut pas, également , être déduit de l'art antérieur.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/78337 A1**

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
A61K 38/17, C07K 14/74, 16/28
- (21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01670
- (22) Date de dépôt international: 16 juin 2000 (16.06.2000)
- (25) Langue de dépôt: français
- (26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité:  
99/07736 18 juin 1999 (18.06.1999) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): AR-  
ACTINGI, Selim [FR/FR]; 8, rue Saint-Simon, F-75007  
Paris (FR). CAROSELLA, Edgardo, Delfino [FR/FR];  
23, rue George Sand, F-75016 Paris (FR). DAUSSET,
- Jean [FR/FR]; 44, rue des Ecoles, F-75005 Paris (FR).  
KHALIL DAHER, Iman [FR/FR]; 25, avenue des Antes,  
F-94150 Rungis (FR). MOREAU, Philippe [FR/FR]; 8,  
rue Bougainville, F-91170 Viry-Chatillon (FR). PAUL,  
Pascale [FR/FR]; 29, rue de la Grange aux Belles,  
F-75010 Paris (FR). ROUAS-FREISS, Nathalie [FR/FR];  
44, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR).
- (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine,  
F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national): CA, IL, JP, US.
- (84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).
- Publiée:  
— Avec rapport de recherche internationale.
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITIONS CONTAINING SOLUBLE FORMS OF HLA-G FOR TREATING INFLAMMATORY SKIN  
PATHOLOGIES

(54) Titre: COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES SOLUBLES D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLO-  
GIES INFLAMMATOIRES DE LA PEAU

(57) Abstract: The invention concerns a composition consisting essentially of at least a soluble form of HLA-G and at least an ac-  
ceptable pharmaceutical carrier for preparing a medicine for treating inflammatory pathological conditions of the skin. The invention  
also concerns a method for obtaining soluble forms of HLA-G and antibodies directed against said soluble forms.

(57) Abrégé: Utilisation d'une composition essentiellement constituée d'au moins une forme soluble d'HLA-G et d'au moins un  
véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la préparation d'un médicament pour le traitement des états pathologiques inflam-  
matoires de la peau. Procédé d'obtention desdites formes solubles d'HLA-G et anticorps dirigés contre lesdites formes solubles.

WO 00/78337 A1

## COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES SOLUBLES D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES DE LA PEAU

La présente invention est relative à l'utilisation de compositions  
5 contenant des formes solubles d'HLA-G dans le traitement de pathologies de la peau et notamment des dermatoses inflammatoires, au procédé d'obtention desdites formes solubles d'HLA-G, ainsi qu'aux anticorps dirigés contre lesdites formes solubles.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui  
10 présentent 3 domaines globulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), et dont le domaine  $\alpha 3$  est associé à la  $\beta 2$  microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les anti-  
15 gènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilloux du placenta humain normal et les cellules épithéliales thymiques.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend  
20 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire  $\alpha 1$ , exon 3 : domaine extracellulaire  $\alpha 2$ , exon 4 : domaine extracellulaire  $\alpha 3$ , exon 5 : région transmembranaire, exon 6 :  
25 domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est  
30 localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cyto-

plasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 1$  et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant  $\alpha 1$ ) avec une séquence AC (issue du domaine codant  $\alpha 3$ ), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine  $\alpha 3$  dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épis-sées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ; le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modifica-tion du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier  
5 l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; et le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; ils ont également montré que ces différents  
10 transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Il existe donc au moins 6 ARNms HLA-G différents qui codent potentiellement 6 isoformes protéiques d'HLA-G, dont 4 membranaires (HLA-G1,  
15 G2, G3 et G4) et 2 solubles (G5, G6).

Il a été montré que l'expression desdites isoformes protéiques d'HLA-G était augmentée par l'interféron  $\gamma$  (Yang et al., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4224-4231).

La fonction immunomodulatrice exercée par ces molécules HLA-G  
20 a été décrite et les mécanismes de cette fonction ont été élucidés par la mise en évidence de leur interaction avec des récepteurs inhibiteurs de la lyse présents sur les cellules NK (récepteurs KIR) conduisant à une inhibition des fonctions cytotoxiques de ces cellules ; par exemple N. ROUAS-FREISS et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1997, 94, 5249-5254) ont montré que les cellules cibles K562 (lignée érythroleucémique  
25 humaine) transfectées par le gène HLA-G étaient protégées de la lyse par les cellules NK. Ces cellules sont habituellement sensible aux cellules NK.

Certains des Inventeurs ont montré que les cellules NK n'expriment aucun transcrit HLA-G (Teyssier et al., *Nat. Immunol.*, 1995, 14, 262-270), ce résultat confirmant que les produits d'expression du gène HLA-G jouent vraisemblablement  
30 un rôle dans les états d'immunotolérance physiologique (grossesse) ou pathologique dans lesquelles les cellules NK sont particulièrement actives (maladies autoimmunes,



transplantations) ou sont au contraire inhibées (présence anormale d'HLA-G sur certaines tumeurs ou lors d'infections virales).

Ainsi, certains des Inventeurs ont également montré que certaines tumeurs expriment des molécules HLA-G, ce qui leur permet d'échapper à la surveillance immunitaire (Paul et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1998, 95, 4510-4515).

L'une des pathologies inflammatoires chronique fréquente est le psoriasis qui est observé chez 2 % des individus des populations caucasiennes. Bien que la maladie se caractérise par une hyperprolifération des kératinocytes de l'épiderme, de très nombreuses études physiopathologiques ont permis de montrer que les lymphocytes T de sous-type Th1, infiltrant le site des lésions et produisant de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), jouaient un rôle prépondérant dans la pathogénèse de cette maladie (Z. Bata-Csorgo et al. J. Investigative Dermatol., 1995, 89S-94S ; Schlaak et al., J. Invest. Dermatol., 1994, 102, 145-149 ; Vogel et al., Eur. J. Biochem., 1995, 227, 143-149). En effet il a été montré que le surnageant de clones de cellules T issus de lésions de psoriasis était capable d'induire l'hyperprolifération de l'épiderme (Strange et al., J. Invest. Dermatol., 1993, 101, 695-700). De même, il a été montré que le maintien du phénotype psoriatique de biopsies de peau humaines greffées chez la souris SCID était dépendant de la co-injection des lymphocytes T issus desdites lésions (Gilhar et al., J. Invest. Dermatol., 1997, 109, 283-288).

L'expression d'HLA-G au niveau des cellules de la peau et son rôle potentiel dans les pathologies associées a été étudié par Ulbrecht et al. (Eur. J. Immunol., 1994, 24, 176-180). Les auteurs de cet article qui analysent uniquement l'expression des transcrits des isoformes membranaires d'HLA-G et en particulier de l'isoforme dominante HLA-G1 montrent qu'alors qu'un niveau faible de transcrits HLA-G est détecté dans les biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis, les transcrits d'HLA-G sont soit absents soit présents à un niveau élevé dans les biopsies de peau saine issues d'individus différents. Ces auteurs concluent donc qu'il n'y a pas de lien évident entre l'expression d'HLA-G et les pathologies de la peau.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé que des formes solubles d'HLA-G ont une action thérapeutique sur des états pathologiques inflammatoires de la peau.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une composition essentiellement constituée d'au moins une forme soluble d'HLA-G et d'au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable (excipient), pour la préparation d'un médicament pour le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau.

5 Les excipients associés à ladite composition sont adaptés à la voie d'administration souhaitée ; ils sont sélectionnés parmi les excipients connus de l'homme du métier.

Lesdites HLA-G solubles peuvent avantageusement être administrées par voie générale (voie orale, voie parentérale) ou par voie locale (administration  
10 topique).

Dans ce dernier cas, ladite composition se présente sous la forme de crème, de lotion, de liposomes ou de gel.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé, de manière inattendue, la présence dans les lésions inflammatoires de la peau, à la fois de macrophages exprimant la protéine HLA-G, localisés au niveau des papilles du derme et de lymphocytes  
15 T CD3<sup>+</sup> infiltrants, exprimant un récepteur inhibiteur des fonctions cytotoxiques, reconnu par HLA-G comme par exemple le récepteur ILT2.

Les Inventeurs ont montré que l'isoforme membranaire dominante HLA-G1 et l'isoforme soluble HLA-G5 sont exprimées uniquement dans les lésions inflammatoires de la peau, alors qu'aucune protéine HLA-G n'est détectée dans la  
20 peau saine.

Les Inventeurs ont également montré que la protéine HLA-G et en particulier une isoforme comprenant au moins le domaine  $\alpha 1$  d'HLA-G est capable d'inhiber les fonctions de prolifération et les fonctions cytotoxiques des lymphocytes  
25 T.

Ainsi, les Inventeurs ont donc mis en évidence le rôle anti-inflammatoire de la protéine HLA-G et en particulier d'une composition constituée d'une forme soluble diffusible comprenant au moins le domaine  $\alpha 1$  d'HLA-G comme par exemple l'isoforme HLA-G5, dans le traitement des pathologies inflammatoires  
30 de la peau.

Conformément à l'invention, ladite composition est particulièrement adaptée au traitement du psoriasis.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite forme soluble d'HLA-G est sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes d'HLA-G solubles comprenant au moins un domaine extracellulaire ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ou  $\alpha 3$ ) et les formes solubilisées d'HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 ou HLA-G4 (isoformes membranaires).

Lesdites HLA-G solubles comprennent au moins le domaine extracellulaire  $\alpha 1$ .

Lesdites formes solubles sont en particulier produites dans un *baculovirus*.

Pour ce qui concerne les formes membranaires, elles sont avantageusement exprimées dans des cellules eucaryotes, conformément au procédé décrit dans la Demande Internationale PCT WO 98/37098, puis solubilisées par traitement de la membrane (agent décapant, tel que la papaïne) et purification convenable, par exemple sur colonne d'immunoaffinité avec des anticorps spécifiques.

On entend par forme soluble d'HLA-G aussi bien les HLA-G solubles (ne comportant pas de domaine transmembranaire) que les HLA-G membranaires solubilisées, par exemple dans les conditions précisées ci-dessus.

De préférence, ladite composition, administrée par voie topique, comprend entre 0,1 et 5  $\mu\text{g/ml}$ , de préférence entre 0,5 et 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de forme soluble d'HLA-G.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADNc de la  $\beta_2\text{M}$  et un autre baculovirus contenant la chaîne  $\alpha$  d'une isoforme soluble d'HLA-G ;
- culture des cellules d'insectes transfectées, et
- récolte des surnageants et purification de l'isoforme d'HLA-G soluble exprimée.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite isoforme d'HLA-G soluble est purifiée à l'aide d'un anticorps spécifique des isoformes d'HLA-G solubles.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ledit anticorps est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, tels que des lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles  
5 HLA-G dont la séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO :1) couplé à la protéine porteuse KLH.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux  
10 dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 et 2 illustrent la présence des ARN des différentes isoformes d'HLA-G dans les lésions de psoriasis, par comparaison avec la peau saine.
- la figure 3 illustre la présence de l'ARN spécifique de l'isoforme HLA-G5 dans les lésions de psoriasis, par comparaison avec la peau saine.
- 15 - la figure 4 illustre l'activité inhibitrice des isoformes HLA-G sur des cellules *natural killer* (cellules NK) présentes dans le sang périphérique ; cette figure comporte en abscisse l'isoforme étudiée et en ordonnée, le pourcentage de lyse spécifique. Des cellules M8 (cellules de lignées de mélanome HLA classe I\*, classe II\*) transfectées soit avec le vecteur seul (M8-pCDNA) (Invitrogen), soit avec les  
20 vecteurs contenant l'ADNc codant HLA-G1 (M8-HLA-G1), l'ADNc codant HLA-G2 (M8-HLA-G2), l'ADNc codant HLA-G3 (M8-HLA-G3), l'ADNc codant HLA-G4 (M8-HLA-G4), sont utilisées comme cibles (T). Des cellules mononucléées de sang périphérique PBMC sont utilisées comme cellules effectrices (E). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse, enregistré en 4h dans un test de libération du chrome  
25  $^{51}\text{Cr}$  ;
- la figure 5 illustre l'activité inhibitrice des isoformes HLA-G sur une lignée de lymphocytes T CD8+ restreinte pour HLA-A2 présentant un peptide viral provenant de la matrice du virus de l'influenza, positions 58 à 66 ; cette figure comporte en abscisse l'isoforme étudiée et en ordonnée, le pourcentage de lyse spéci-  
30 fique ; le ratio cellules effectrices/cellules cibles est de 15:1.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Production d'une forme soluble d'une isoforme d'HLA-G chez un baculovirus.**

L'isoforme soluble HLA-G5 dont la structure est composée de 3 domaines extracellulaires  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  associée à la  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2M$ ), est issue d'un transcrit alternatif possédant un codon stop dans l'intron 4 du gène HLA-G. La production d'une protéine HLA-G soluble recombinante fait appel à une co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADN complémentaire de la  $\beta 2M$  et d'un autre baculovirus contenant l'ADNc de la chaîne  $\alpha$  de HLA-G5. Cela permet en effet d'obtenir la forme physiologique HLA-G5/ $\beta 2M$ .

**1. Construction de vecteurs de transfert pour la recombinaison avec le virus BacTen.**

**a- Insertion du gène  $\beta 2M$  dans un vecteur de transfert :**

La séquence d'ADN codante  $\beta 2M$  est insérée dans les sites BglII-KpnI du vecteur de transfert pTen12 (Quantum). Le clone recombinant est vérifié par digestion enzymatique, puis amplifié et stérilisé en vue de la cotransfection avec l'ADN du baculovirus BacTen linéarisé.

**b- Insertion du gène codant HLA-G5 dans un vecteur de transfert :**

La séquence codant la molécule HLA-G5 est insérée dans les sites BglII-KpnI du vecteur de transfert pTen12. Le clone recombinant est vérifié par digestion enzymatique, puis amplifié et stérilisé en vue de la cotransfection avec l'ADN du baculovirus BacTen (Quantum) linéarisé.

**2. Construction de baculovirus recombinants.**

La première étape consiste à obtenir des baculovirus recombinants HLA-G5A d'une part et  $\beta 2M$  d'autre part. Les deux vecteurs de transfert portant les gènes  $\beta 2M$  et HLA-G5A sont placés en présence de BacTen linéaire afin de cotransfecter les cellules d'insecte Sf9 en culture. Les surnageants de cotransfection sont récoltés et un clonage par plaques de lyse est réalisé pour isoler les clones des baculovirus recombinants. Afin de garantir la qualité de la construction, l'ADN des clones

viraux est extrait et l'insertion du gène dans le bon *locus* viral est vérifiée par PCR. Six clones ont été obtenus pour chacune des constructions et chacun a servi à infecter à nouveau des cellules Sf9. Les surnageants de culture ainsi que les cellules ont ensuite été récupérés après centrifugation. Cette protéine est purifiée par immunoaffinité à l'aide des anticorps PAG5-6 (voir exemple 4). La structure de la protéine est vérifiée par *western blot* à la fois avec des anticorps PAG5-6 (anti-HLA-G5) et des anticorps B1G6 (Immunotech) (anti- $\beta$ 2M) spécifiques respectivement de la forme soluble HLA-G5 et de la  $\beta$ 2M. Parmi les 6 clones produisant HLA-G5, et les 4 produisant  $\beta$ 2M, un a été sélectionné de chaque. Un clone HLA-G5 $\alpha$  et un clone  $\beta$ 2M ont été utilisés pour coinfecter des cellules Sf9. Par analyse en *western blot* et immunoprécipitation avec un anticorps conformationnel W6/32 (IgG2a, anti-chaînes  $\alpha$  de HLA de classe I associées à la  $\beta$ 2-m (Sigma)), on peut montrer que le surnageant de cette coinfection contient la protéine HLA-G5 associée à la  $\beta$ 2M ; elle présente ainsi une forme proche de la forme physiologique. Ces cellules Sf9 permettent donc d'obtenir de grandes quantités de protéine soluble HLA-G5.

**EXEMPLE 2 : Mise en évidence du rôle régulateur d'HLA-G dans les phénomènes T dépendants liés au psoriasis.**

**1. Origine des biopsies de peau**

Des biopsies de peau présentant des plaques typiques de lésions de psoriasis chronique, issues de patients n'ayant subi aucun traitement local ou général dans les 15 jours précédant le jour de la biopsie ont été analysées.

Des biopsies de peau saines issues de patientes ayant subi une chirurgie mammaire réductrice sont utilisées comme témoin négatif.

Les échantillons sont séparés en deux, une partie est immédiatement congelée dans l'azote liquide pour l'analyse RT-PCR et la partie restante est incluse dans l'OCT (Miles Inc Diagnostics Division) pour l'analyse immunohistochimique.

**2. Mise en évidence de l'ensemble des transcrits HLA-G et du transcrit spécifique de l'isoforme HLA-G5 soluble dans les biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis**

**a) Matériels et méthodes**

Les ARN messagers sont extraits de biopsies congelées de 6 spécimens de peau lésée de psoriasis (Pso1-Pso-6, figures 1 et 3) et de 4 spécimens de peau

normale (Peau saine 1-Peau saine 4, figures 2 et 3) dans les conditions suivantes ; les échantillons sont mis en présence du réactif *RNA Now* (Biogentex, Inc.) et homogénéisés à l'aide de l'homogénéisateur *ultraturrax* (IKA Labortechnik), selon les recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN extrait est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% en condition dénaturantes. 5 µg d'ARN sont reverse transcrits en ADNc à l'aide d'une amorce oligo dT de 12 à 18 oligonucléotides (Gibco BRL) et de la transcriptase reverse du virus de Moloney (M-MLV), pendant 1 h à 42°C. Puis, l'ADNc obtenu est amplifié par PCR avec d'une part des amorces reconnaissant l'ensemble des transcrits HLA-G [amorce G.257 (exon 2) et 3G.U (extrémité 3' non-traduite)], utilisées pour l'amplification PCR des transcrits HLA-G correspondants aux différentes isoformes connues d'HLA-G (figures 1 et 2) et d'autre part des amorces spécifiques de la séquence HLA-G5 soluble, à savoir les amorces G.526 et G.i4b (figure 3).

De manière plus précise, les différentes amorces et sondes utilisées sont en conséquence les suivantes :

- G.526 (exon 3) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G1, G4 et G5 ;
- G.526 (exon 3) et G.i4b (intron 4) pour l'isoforme G5 ;
- G.-3 (recouvrant partiellement les exons 2 et 4) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G2 et G6 ;
- G.3-4 (recouvrant partiellement les exons 2 et 5) et G3.U (3' UT) pour l'isoforme G3.

Les conditions de PCR sont les suivantes : 1 min à 90°C, 90 s à 65°C (61°C pour le couple d'amorces G.526 et G.i4b) et 2 min à 72°C, pendant 35 cycles. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 %.

Les transcrits de la  $\beta$ -actine sont co-amplifiés, pendant 16 cycles, à l'aide d'amorces spécifiques (Clontech) pour normaliser la quantité d'ARN entre les différents échantillons.

Les produits PCR sont ensuite transférés sur une membrane de nylon (*Hybond N<sup>+</sup>*, Amersham), hybridés avec une sonde radiomarquée et l'intensité du signal d'hybridation est quantifiée par densitométrie.

Les sondes HLA-G spécifiques sont les suivantes :

- GR spécifique de l'exon 2 qui reconnaît tous les transcrits d'HLA-G, et
  - G.I4 F spécifique de l'intron 4, qui ne reconnaît que le transcrit
- 5 HLA-G5.

Les amorces et les sondes ci-dessus sont décrites dans P. MOREAU et al., C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences, 1995 ; 318 ; 837-42).

L'ADNc des cellules de choriocarcinome JEG-3 (ATCC), possédant un niveau de transcription élevé d'HLA-G sont utilisés comme témoin positif. Dans

10 les essais ci-dessus, la lignée JEG-3 est cultivée dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de veau foetal à 10 %, inactivé à la chaleur, des antibiotiques et de la L-glutamine 2 mM. Les lignées cellulaires ne contiennent pas de mycoplasmes.

Les bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la

15 sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les produits de la PCR, co-amplifiés au cours de la même réaction, avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane à l'aide d'une sonde  $\beta$ -actine.

#### **b) résultats**

Les résultats sont illustrés dans les figures 1 à 3.

20 Les transcrits d'HLA-G sont détectés dans tous les échantillons de peau lésée présentant des lésions de psoriasis et dans seulement 2 des 4 échantillons de peau saine. A l'exception d'un échantillon (échantillon 3), seuls les transcrits correspondant aux isoformes HLA-G1 et HLA-G5 sont détectés dans les échantillons de peau lésée. Dans les biopsies de peau lésée de 6 malades ayant un psoriasis, il

25 existe un niveau transcriptionnel HLA-G plus élevé, en particulier concernant l'isoforme G1/G5 ( $p < 0,05$  ; figures 1 et 3).

Dans ces échantillons, le signal de l'isoforme HLA-G5 soluble est absent des 4 spécimens de peaux normales (figure 3), mais retrouvé chez 3 des 6 sujets présentant un psoriasis (figure 3).

30 L'ensemble des résultats montre que le niveau des transcrits HLA-G1 et G-5 est plus élevé dans les biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis



que dans les échantillons de peau saine et que le transcrit HLA-G5 est exprimé uniquement dans les biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis.

### 3. Mise en évidence de la protéine HLA-G dans les biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis

#### 5 a) Matériels et méthodes

##### a<sub>1</sub>) immunohistochimie

Des coupes au cryostat ont été réalisées à partir des échantillons congelés puis les coupes ont été déshydratées dans l'acétone à -20°C pendant 20 min et séchées à l'air libre.

10 L'immunomarquage est réalisé à l'aide du kit *Dako EnVision+System Peroxidase (AEC)*, (Dako) selon les instructions du fabricant.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- 87G et O1G spécifiques d'HLA-G (HLA-G1 à -G5) et 16G1 spécifique d'HLA-G5 (D. Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center,  
15 Seattle, USA),

- 4H84 spécifique des isoformes d'HLA-G sous forme dénaturée (M. Mc Master, San Francisco, USA) - anti-ILT2 qui reconnaît un KIR impliqué dans la liaison à HLA-G (Navarro et al., Eur. J ; Immunol., 1999, 29, 277-283),

- W6/32 : anti antigène de classe I du CMH (Sigma)

20 - anti-CD3 (Sigma)

- anti CD 14 (Sigma)

- IgG2a de souris : anticorps contrôle (Sigma),

##### a<sub>2</sub>) double marquage

Les doubles marquages sont réalisés avec les couples d'anticorps

25 suivants :

- 87G et anti-CD68

- 87G et anti-CD11c (Dako)

- anti-ILT2 et anti-CD3

Les conditions utilisées sont les suivantes ; après incubation avec du  
30 sérum normal de chèvre, les coupes sont incubées avec le premier anticorps (87G ou anti-ILT2) pendant 60 min, rincées, puis incubées avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé au rouge Texas. Ensuite les coupes sont rincées et incubées

pendant 30 min avec le second anticorps couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) : anticorps anti-CD68 ou anti-CD11c, lorsque le premier anticorps est 87G ou bien anticorps anti-CD3, lorsque le premier anticorps est anti-ILT2.

Dans les coupes contrôles, le premier anticorps (87G ou anti-ILT2)  
5 est remplacé par l'anticorps contrôle (IgG2a de souris).

Les coupes sont ensuite analysées en microscopie confocale à laser.

#### b) résultats

##### b<sub>1</sub>) Détection de l'ensemble des protéines HLA-G et de la protéine HLA-G5 soluble dans les biopsies de peau

10 En utilisant l'anticorps 87G ou l'anticorps O1G qui reconnaissent toutes les isoformes d'HLA-G, aucune expression de la protéine HLA-G n'est détectée dans les échantillons de peau saine.

En revanche, dans les 9 échantillons de peau présentant des lésions de psoriasis, l'expression d'HLA-G est détectée dans des cellules des papilles du  
15 derme. Le niveau d'expression d'HLA-G est variable selon les échantillons ; il est élevé dans certains échantillons. De plus, dans deux échantillons seulement, l'expression d'HLA-G est également détectée dans l'épiderme, dans des zones proches de l'infiltrat de cellules inflammatoires du derme, soit au niveau de foyers isolés de cellules inflammatoires ou bien dans quelques kératinocytes. La localisation  
20 d'HLA-G au niveau de ces quelques kératinocytes est vraisemblablement liée à la diffusion de l'isoforme HLA-G5 à partir des cellules du derme exprimant ladite isoforme.

En utilisant l'anticorps 16G1 qui reconnaît spécifiquement l'isoforme HLA-G5 soluble, un marquage spécifique des cellules des papilles du  
25 derme est également détecté.

##### b<sub>2</sub>) Localisation des cellules exprimant HLA-G dans les lésions de psoriasis

Les doubles marquages avec l'anticorps 87G et l'anticorps anti-CD3 ou l'anticorps anti-CD14 montrent qu'HLA-G est co-localisée au niveau des cellules  
30 exprimant CD14, en revanche aucune co-localisation d'HLA-G avec les lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) n'est observée.

b<sub>3</sub>) Les cellules exprimant HLA-G sont des macrophages CD68<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>

Le marquage des coupes sériees des échantillons de peau présentant des lésions de psoriasis avec les anticorps 87G et anti-CD68 ou anti-CD11c qui  
5 reconnaissent spécifiquement les macrophages, démontrent que la quasi-totalité des cellules qui expriment HLA-G expriment aussi CD68 et CD11c et sont donc des macrophages.

b<sub>4</sub>) Le récepteur KIR de type ILT2 est présent dans les lymphocytes T infiltrant des lésions de psoriasis

10 Le marquage des biopsies de peau présentant des lésions de psoriasis avec l'anticorps anti-ILT2 montre la présence d'un infiltrat dense au niveau du derme superficiel. En revanche aucun marquage n'est détecté dans le derme des échantillons de peau saine. De plus, des expériences de double marquage avec les anticorps anti-CD3 et anti-ILT2 montre la présence de quelques cellules doublement marquées au  
15 niveau des papilles du derme.

En résumé, l'ensemble des résultats présentés ci-dessus montrent que :

- dans la peau saine l'expression des ARN HLA-G est faible ou indétectable et la protéine HLA-G est absente,
- 20 - dans les lésions de psoriasis il existe une expression accrue des ARN et de la protéine des isoformes HLA-G1 et -G5,
- dans les lésions de psoriasis l'expression d'HLA-G est localisée au niveau de macrophages et
- dans les lésions de psoriasis, les lymphocytes T infiltrants  
25 expriment un récepteur inhibiteur des fonctions cytotoxique reconnu par HLA-G (récepteur ILT2).

Ces résultats montrent la présence au niveau des lésions de psoriasis, à la fois de cellules exprimant HLA-G (macrophages des papilles du derme) et de cellules infiltrantes responsables des lésions de psoriasis (lymphocytes T CD3<sup>+</sup>),  
30 exprimant un récepteur inhibiteur des fonctions cytotoxique reconnu par HLA-G (récepteur ILT2).

En conséquence ces résultats démontrent le rôle direct d'HLA-G et en particulier de l'isoforme membranaire prédominante HLA-G1 et de l'isoforme soluble diffusible HLA-G5 dans la régulation locale des phénomènes T dépendants responsables du psoriasis.

5 **EXEMPLE 3 : Rôle du domaine extracellulaire  $\alpha 1$  d'HLA-G dans l'inhibition des fonctions immunes et application dans le traitement du psoriasis**

1. Rôle du domaine extracellulaire  $\alpha 1$  d'HLA-G dans l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK -et des cellules T

a) cellules NK

10 L'utilisation de cellules transfectées avec chacune des isoformes HLA-G1, -G2, -G3 ou -G4 en tant que cellules cibles face à des cellules immuno-compétentes *natural killer* présentes dans le sang périphérique permet de démontrer que chacune des isoformes est capable d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules *natural killer* (Fig. 4). Ces expériences ont été effectuées chez plus de dix donneurs  
15 volontaires sains et la significativité de l'inhibition exercée par chacune des isoformes a été validée par des tests statistiques (Fig. 4).

b) cellules T

Des tests similaires de cytotoxicité *in vitro* réalisés avec les mêmes cellules cibles faces à des cellules T CD8+ restreintes par le CMH et spécifiques d'un  
20 peptide antigénique ont également démontré que chacune des isoformes HLA-G1, -G2, -G3 et -G4 inhibe de façon significative l'activité cytotoxique de ces cellules T (Fig. 5).

Sur la base de la structure de l'isoforme HLA-G3 constituée uniquement du domaine extracellulaire  $\alpha 1$  possédant toutes les propriétés inhibitrices  
25 décrites ci-dessus, on peut conclure à la fonctionnalité de ce domaine. Ce domaine contient donc le motif fonctionnel de HLA-G et pourra donc être utilisé comme agent pharmacologique en vue d'une immunotolérance.

2. Application dans le traitement du psoriasis

Le rôle direct d'HLA-G et en particulier de l'isoforme membranaire  
30 prédominante HLA-G1 et de l'isoforme soluble diffusible HLA-G5 dans la régulation locale des phénomènes T dépendants responsables du psoriasis a été démontrée à l'exemple 2.

Le rôle d'HLA-G et en particulier du domaine  $\alpha 1$  desdites isoformes dans l'inhibition des fonctions T a été démontrée ci-dessus.

En conséquence, l'ensemble des résultats indiquent qu'une composition pharmaceutique contenant ladite isoforme HLA-G en particulier sous forme soluble diffusible, comme l'isoforme HLA-G5, présente un rôle protecteur dans le traitement du psoriasis.

**EXEMPLE 4 : Production d'un anticorps nommé PAG5-6 reconnaissant spécifiquement les formes solubles de HLA-G (HLA-G5 et HLA-G6) sous forme d'un sérum polyclonal obtenu chez le lapin.**

L'immunisation de lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles HLA-G dont la séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO:1) couplé à la protéine porteuse KLH, permet d'obtenir un sérum polyclonal reconnaissant spécifiquement les formes solubles de HLA-G (HLA-G5 et HLA-G6) par les techniques d'immunoprécipitation, immunoempreinte (Western Blot), immunohistochimie et immunoenzymatique type ELISA. Ce sérum a été purifié sur colonne d'affinité (protéine G-Sépharose) et peut à la fois servir à la détection, la titration, et la purification des formes solubles HLA-G.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une composition essentiellement constituée d'au moins une forme soluble d'HLA-G et d'au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la préparation d'un médicament pour le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite forme soluble d'HLA-G est sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes d'HLA-G solubles comprenant au moins le domaine extracellulaire  $\alpha 1$  et les formes solubilisées d'HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 ou HLA-G4.

3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition comprend entre 0,1 et 5  $\mu\text{g/ml}$ , de préférence entre 0,5 et 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de forme soluble d'HLA-G.

4°) Procédé de préparation d'une HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADNc de la  $\beta_2\text{M}$  et un autre baculovirus contenant la chaîne  $\alpha$  d'une isoforme d'HLA-G soluble ;

- culture des cellules d'insectes transfectées, et

- récolte des surnageants et purification de l'isoforme d'HLA-G soluble exprimée.

5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite isoforme d'HLA-G soluble est purifiée à l'aide d'un anticorps spécifique des isoformes d'HLA-G soluble.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit anticorps est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, notamment des lapins avec un peptide immunogène de SEQ ID NO:1 couplé à la protéine porteuse KLH.

7°) Anticorps anti-HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, notamment des lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés de SEQ ID NO:1 couplé à la protéine porteuse KLH.

1/4

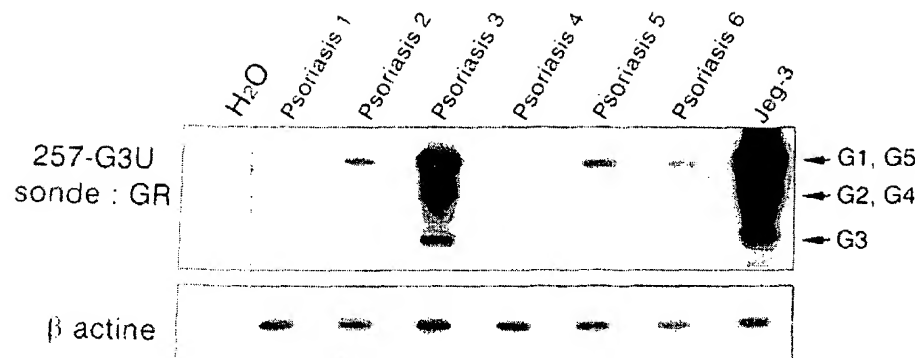


FIGURE 1

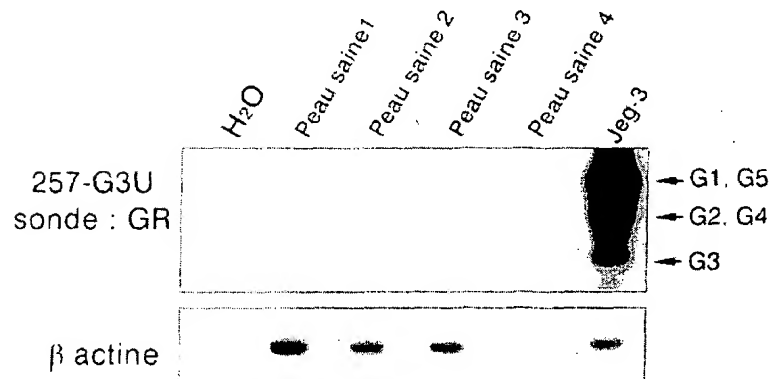


FIGURE 2

2/4

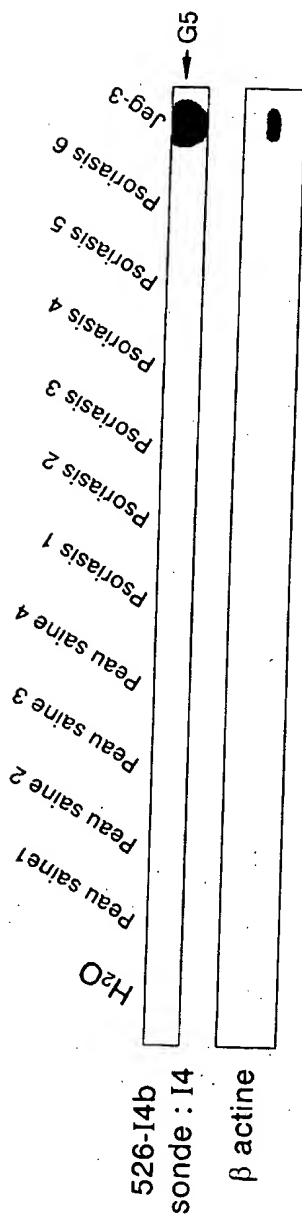
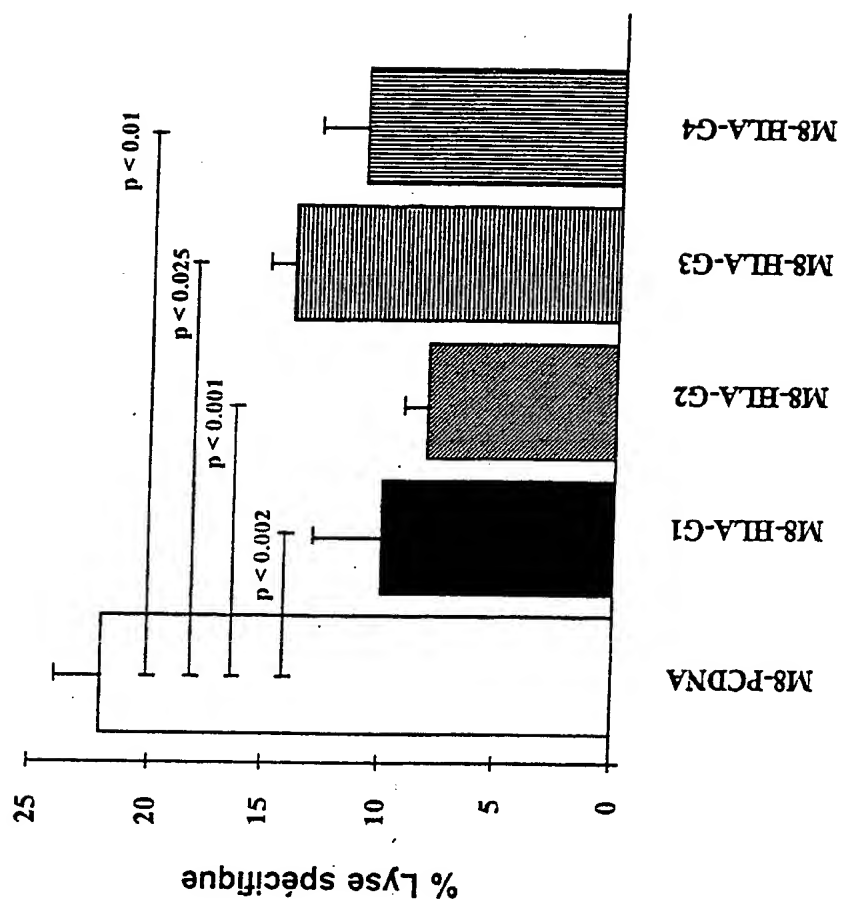


FIGURE 3

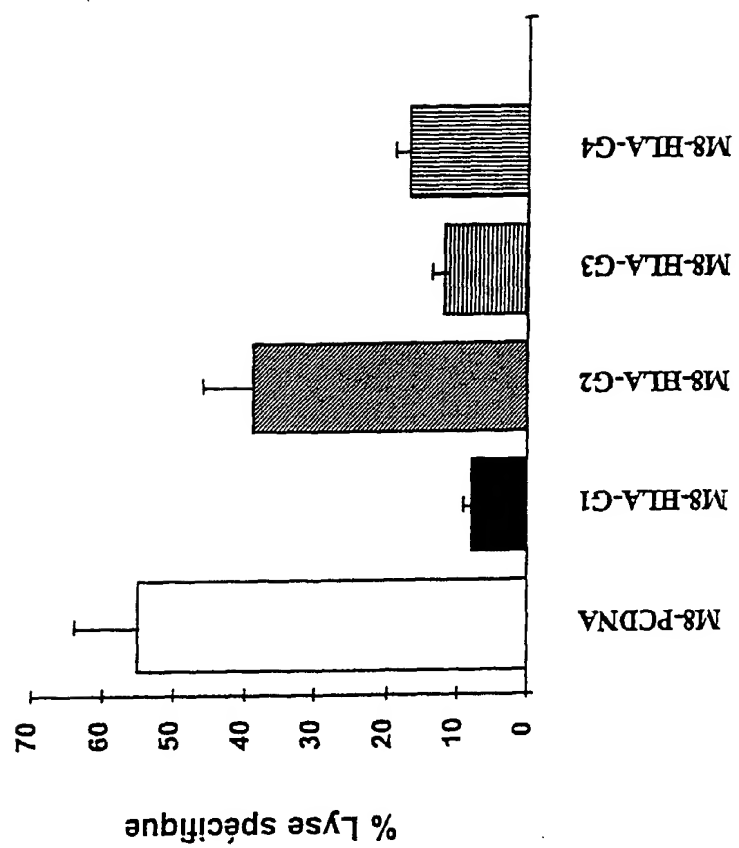


3/4



ratio effecteur : cible 50 : 1

FIGURE 4



ratio effecteur : cible 15 : 1

FIGURE 5

## LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
ARACTINGI, Selim  
CAROSELLA, Edgardo Delfino  
DAUSSET, Jean  
KHALIL DAHER, Iman  
MOREAU, Philippe  
PAUL, Pascale  
ROUASS-FREISS, Nathalie

<120> UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES  
SOLUBLES D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES  
INFLAMMATOIRES DE LA PEAU, ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION

<130> seq263EXT55

<140>  
<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
Ser Lys Glu Gly Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser.  
1 5 10 15  
Leu Ser Glu Asp Leu  
20

# TRAITE OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>BL0cp263/55P</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 01670</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>16/06/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>18/06/1999</b>
Déposant  <b>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.
2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre,**

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES SOLUBLES D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES DE LA PEAU**

**5. En ce qui concerne l'abrégé,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°**

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR 00/01670

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K38/17 C07K14/74 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT, LIFESCIENCES, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ULBRECHT M ET AL: "HLA-G: EXPRESSION IN HUMAN KERATINOCYTES IN VITRO AND IN HUMAN SKIN IN VIVO" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 1, 1994, pages 176-180, XP002007031 alinéa '03.3!; figure 4 page 180, colonne 1	1-3
X	WO 98 37098 A (CAROSELLA EDGARDO DELFINO ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); KIR) 27 août 1998 (1998-08-27) cité dans la demande page 4, ligne 26 -page 6, ligne 2 revendications 1,12-14	4-6

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01670

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837098	A	27-08-1998	FR 2760023 A	28-08-1998
			CA 2251645 A	27-08-1998
			EP 0917538 A	26-05-1999
WO 9631604	A	10-10-1996	AU 696118 B	03-09-1998
			AU 5256896 A	23-10-1996
			CA 2213620 A	10-10-1996
			EP 0819171 A	21-01-1998
			JP 11503320 T	26-03-1999
EP 0677582	A	18-10-1995	FR 2717498 A	22-09-1995
			US 5856442 A	05-01-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No

PCT/FR 00/01670

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 31604 A (UNIV CALIFORNIA) 10 octobre 1996 (1996-10-10) revendications 1-3, 15-18 ---	7
A	EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 18 octobre 1995 (1995-10-18) cité dans la demande -----	